

## マウス生殖系細胞の増殖・分化に関わる蛋白キナーゼ遺伝子の単離とその解析

著者	松原 信行
号	1454
発行年	1998
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21585">http://hdl.handle.net/10097/21585</a>

氏 名（本籍）	まつ 松	ばら 原	のぶ 信	みち 行
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 4 5 4 号			
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	マウス生殖系列細胞の増殖・分化に関わる蛋白キ ナーゼ遺伝子の単離とその解析			

（主 査）

論文審査委員	教授 貫 和 敏 博	教授 田 村 眞 理
	教授 矢 嶋 聰	

## 論 文 内 容 要 旨

哺乳動物の生殖系列細胞の増殖・分化・生存にはいくつかの内在性因子、環境因子が関与することが知られている。しかし *in vivo* で生殖細胞の増殖や分化に関わる因子はほとんど分かっておらず、特に始原生殖細胞の増殖や分化に関与する因子は c-Kit レセプター型チロシンキナーゼとそのリガンド SL 因子以外に分かっていない。また減数分裂に関与する因子についてもほとんどわかっていない。多くの増殖因子受容体や情報伝達因子が蛋白キナーゼであることから、生殖細胞の増殖・分化に *in vivo* で関与する蛋白キナーゼ遺伝子の単離と、解析を目的とした。

始原生殖細胞由来の幹細胞株 Embryonal Germ Cell の cDNA に対し、蛋白キナーゼ領域に対応する primer を用いて RT-PCR を行い、20 種類の蛋白キナーゼ遺伝子断片を得て、Northern blot でマウス生殖巣の有意に発現する GCK3 (Plk1), GCK4 (Sky) を選び、それぞれ遺伝子を単離した。

GCK3 は赤白血球細胞株から単離されたセリン/スレオニンキナーゼ遺伝子 Plk1 (Polo like kinase 1) と同一であり、ショウジョウバエ polo 遺伝子のマウスホモログの可能性が考えられた。polo は体細胞分裂と減数分裂において微小管に関連し、染色体分配に関与するセリンスレオニンキナーゼである。そこでこの遺伝子の生殖巣での発現を *in situ* hybridization で解析した。

胎齢 18.5 日では精巣にはほぼ均一に Plk1 遺伝子が発現するが、生後 3 週令ではディプロテン期・ディアキネシス期の第一精母細胞と、第二精母細胞、初期の精細胞に局限して強く発現した。また胎齢 18.5 日の卵巣ではほぼ均一に Plk1 遺伝子が発現するが、出生時には中央部の成長を始めた卵母細胞で発現し、卵母細胞の成長に伴いシグナルが増強した。この結果から、マウス Plk1 は雌雄の減数分裂期に *in vivo* で発現することが明らかになった。雌雄の減数分裂期に機能する蛋白キナーゼは哺乳動物では報告が無く Plk1 遺伝子はその初めての候補と考えられた。

もう一つの遺伝子 GCK4 は肝細胞癌株、脳、奇形細胞癌株からそれぞれ単離された Sky と同一であった。Sky はレセプター型チロシンキナーゼをコードしており、その細胞外領域は NCAM などの接着分子様構造を示した。また NIH3T3 細胞由来の Gas6 (Growth Arrest Specific gene 6) が最近 Sky リガンドであると報告されたが、その機能として明らかになったのは血管平滑筋細胞とシュワン細胞の増殖を支持することのみであり、生殖系での機能は不明である。本研究ではまず Sky 遺伝子の生殖巣での発現を検討した。

その結果、雄では胎齢 12.5 日、14.5 日に PGC とそれに隣接する pre-Sertoli 細胞の両方に Sky 遺伝子のシグナルが見られたが、出生後にはセルトリ細胞の細胞質にのみ強いシグナルが認められた。一方雌では出生前後の一時期のみ卵巣中央部の cuboidal cell にシグナルが認められ

た。このことから Sky は雄では PGC と pre-Setoli 細胞に in vivo で発現し、これら細胞間の情報伝達に關与する可能性が考えられ、雌雄の発現の違いからはセルトリ細胞の分化などの性分化に關与する可能性も考えられた。また精細胞が出現する生後 21 日精巢のセルトリ細胞での発現が減弱し、セルトリ細胞での Sky 遺伝子の発現は分化した生殖細胞から抑制されていることが示された。

次に Sky リガンドである Gas6 蛋白の生殖巣での発現を解析した。その結果雄の胎齡 12.5 日、14.5 日の生殖隆起と成体の精巢では Sky を発現していた細胞を取り囲む細胞で強いシグナルがみられた。また卵巣では莢膜細胞と黄体で発現していた。Sky と Gas6 の両方が隣接した細胞で発現していることから Gas6 は PGC の増殖または生存に關与する可能性が示唆された。

そこで PGC 初代培養系でリコンビナント Gas6 の効果を検討した。その結果 Steel 因子の存在下でのみ PGC の増殖又は生存を支持することが分かった。

本研究により Gas6/Sky の情報伝達系が、c-kit/Sl 以外には明らかでなかった PGC の増殖又は生存に關与することが明らかになり、Sky が生殖細胞とセルトリ細胞の細胞間相互作用に in vivo で關与することが強く示唆された。

## 審査結果の要旨

哺乳動物生殖系列細胞の増殖・分化・生存にはいくつかの内在性因子、環境因子が関与する。しかし始原生殖細胞（PGC）の増殖や分化に生体内で関与する因子は、c-Kit レセプター型チロシンキナーゼとそのリガンド S1 因子以外に知られておらず、減数分裂に関与する因子についてもほとんど未知の領域である。本学位申請者は、かかる生殖細胞の増殖・分化に *in vivo* で関与する蛋白キナーゼ遺伝子を単離し解析した。

PGC 由来幹細胞（embryonal germ cell）の cDNA と、キナーゼ活性配列に対するプライマーを用いて RT-PCR を行い、マウス生殖巣に有意に発現する Plk1, Sky 遺伝子を northern blot で選び、それぞれ cDNA ライブラリーから単離、解析し、以下の結果を得た。

(1) Plk1 遺伝子は、体細胞分裂と減数分裂において、染色体分配に関与するセリンスレオニンキナーゼであるショウジョウバエ polo 遺伝子の、マウスホモログの可能性が示唆されていた。生殖巣での発現を *in situ hybridization* で解析した結果、マウス精巣ではディプロテン期・ディアキネシス期の第一精母細胞と、第二精母細胞、初期の精細胞に限局して強く発現し、一方卵巣では卵母細胞の成長に伴いシグナルが増強した。この結果は、マウス Plk1 遺伝子が減数分裂時に発現することを意味する。雌雄の減数分裂期に機能する蛋白キナーゼは哺乳動物では報告がなく、Plk1 遺伝子はその初めての候補と考えられる。

(2) Sky 遺伝子は肝細胞癌株、脳、奇形細胞癌株からそれぞれ単離され、そのリガンド Gas6 は血管平滑筋細胞とシュワン細胞の増殖を支持することが報告されていたが、これら因子の生殖巣での発現・機能は不明であった。Sky 遺伝子と Gas6 の生殖巣での発現を検討した結果、胎生期精巣の精細管内を占める PGC とセルトリ前駆細胞に Sky シグナルを認めた。また Sky 発現細胞を取り囲む細胞群で、強い Gas6 シグナルがみられた。さらに PGC 初代培養系でリコンビナント Gas6 の効果を検討したところ、Steel 因子の存在下では PGC の増殖や生存を支持することを明らかにした。

本研究の意義は 2 つある。(1) Plk1 遺伝子が、哺乳動物では未知であった雌雄の減数分裂期に機能する蛋白キナーゼ遺伝子として、初めての候補であることを明らかにした。(2) Sky と Gas6 の情報伝達系が PGC の増殖や生存に生体内では関わり、生殖細胞とセルトリ細胞の細胞間相互作用に関与する。ことに後者の結果は、今まで c-Kit/S1 因子による情報伝達系以外に不明であった、生体における PGC 増殖・生存の制御に手がかりを得た点が評価できる。かかる点より本論文は学位に値すると判定される。